

Význam imunitního systému a možnosti imunoterapie u maligního melanomu

Importance of the Immune System and Immunotherapeutic Options in Malignant Melanoma

Krajsová I.

Dermatovenerologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

Souhrn

V posledních několika letech došlo k významným změnám v léčbě metastazujícího melanomu. Byly objeveny nové léčebné postupy využívající inhibice kontrolních bodů imunity k podpoře protinádorové imunitní reakce. Nejnovější výsledky studií s anti-CTLA-4 a anti-PD-1 monoklonálními protilátkami ukazují na schopnost imunoterapie významně prodloužit dobu přežití bez progresu a celkové přežití u pacientů s metastazujícím melanomem v porovnání s chemoterapií i dalšími léčebnými metodami. Článek je zaměřen na účinnost a bezpečnost těchto léčebných postupů a možné biomarkery léčebné odpovědi.

Klíčová slova

maligní melanom – imunoterapie – ipilimumab – nivolumab – pembrolizumab – kombinovaná imunoterapie – biomarkery

Summary

Over the past several years, many important changes in the treatment of metastatic melanoma have occurred. New treatment options have been discovered to exploit inhibition of immune checkpoints for promotion of antitumor immune response. Recent results of clinical studies with anti-CTLA-4 and anti-PD-1 monoclonal antibodies show the ability of immunotherapy to extend progression-free survival and overall survival in patients with metastatic melanoma when compared to chemotherapy and other therapeutic methods. This article focuses on efficacy and safety of these immunotherapeutic approaches and considered biomarkers of tumor response.

Key words

malignant melanoma – immunotherapy – ipilimumab – nivolumab – pembrolizumab – combined immunotherapy – biomarkers

Prohlašuji, že v souvislosti s výše uvedeným příspěvkem, jehož jsem autorem, mám střet zájmů s níže vypsányi společnostmi: BMS, MSD, Novartis a Roche (honoraria za konzultace a přednáškovou činnost).

I declare that, in connection with the above mentioned contribution, which I am an author, I have a conflict of interest with the following companies: BMS, MSD, Novartis and Roche (consultations and lectures honorarias).

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Ivana Krajsová, MBA
Dermatovenerologická klinika
1. LF UK a VFN v Praze
U Nemocnice 2
128 08 Praha 2
e-mail: krajsova@vfn.cz

Obdrženo/Submitted: 24. 7. 2015

Přijato/Accepted: 10. 9. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154556>

Úvod

Melanom vzniká maligní transformací melanocytů, buněk neurální lišty, které v průběhu vývoje osídlují zejména bazální vrstvu epidermis a vlasových folikulů, ale některé cestují i dále do oblasti sliznic zažívacího, urogenitálního i dýchacího traktu. Melanocyty je možné prokázat i v různých strukturách oka, zejména v choroidee, nebo ucha, v kochle. Jednoznačně nejčastější klinickou variantou je primárně kožní melanom, ale vzhledem k uvedenému rozšíření melanocytů je nutné počítat i s možností jeho primárního vzniku mimo oblast kůže. Přesná příčina vzniku melanomu nebyla dosud prokázána, ale v etiologii melanomu hraje nezanedbatelnou roli ultrafialové (UV) záření vyvolávající typické pyrimidinové mutace a světlý kožní fototyp s převahou tvorby feomelaninu, který se podílí na vzniku kyslíkových radikálů v kůži. Transformace melanocytů v nádorové buňky je komplexní proces vznikající postupně celou řadou molekulárních odchylek, jako jsou genetické mutace a amplifikace onkogenů vedoucí k nekontrolovanému buněčnému růstu, angiogenezi a úniku z imunitního dohledu hostitele [1].

Primárním úkolem imunitního systému je ochrana před infekcí, ale již před mnoha lety bylo prokázáno, že je schopný reagovat i proti nádorovým buňkám. Základním rysem imunitního systému je schopnost rozlišit buňky těla vlastní a buňky těla cizí, tedy patogenní. Rozpoznání nádorových buněk, jako by byly cizí, je ale pro imunitní systém obtížnější, protože primárně vznikají z vlastních buněk, jsou obklopeny a maskovány autoantigeny a své „cizorodé“ antigeny umí dokonale skrýt. Význam imunitního systému při rozvoji melanomu je odvozován z různých pozorování. Melanom je imunogenní nádor s typickými diferenciačními antigeny jako MART-1, gp100, tyrozináza, tyrozinázový protein 1 a 2 (TRP1, TRP2), MAGE A3, NY-ESO-1. Průkaz celulózní i humorální imunity proti uvedeným antigenům naznačuje, že imunitní systém je schopný rozpoznat tyto antigeny jako cizí. Na důležitou roli imunitního systému ukazují dále často pozorované parciální i kompletní spontánní regrese pri-

márního melanomu nebo průkaz tumor infiltrujících lymfocytů, kdy jejich množství a distribuce korespondují s příznivějším průběhem onemocnění. Také nemocní v imunosupresi, ať již iatrogenní, nebo vyvolané probíhajícími onemocněními mají vyšší riziko vzniku melanomu.

Na druhou stranu ale může dojít k rozvoji melanomu i u imunokompetentních, zcela zdravých jedinců. Za jednu z příčin je považována schopnost nádorových buněk produkovat imunosupresorické a proapoptické faktory, které přímo v místě nádoru brání imunitnímu systému v jejich rozpoznání a blokují funkci cytotoxických T lymfocytů. Nádorové buňky mohou vydávat signály, které mění efektorové T lymfocyty v tolerantní T lymfocyty, které ještě navíc mohou podporovat lokální imunosupresi. Jedním z klíčových imunosupresorických faktorů jsou T regulační lymfocyty (Treg). Průkaz CD4⁺, CD25⁺, FOXP3⁺ Treg u melanomů v radiální fázi růstu naznačuje, že tyto buňky mohou navozovat imunitní toleranci v časných fázích vývoje melanomu [2].

Dalším s imunitou souvisejícím faktorem, který se může podílet na vzniku různých nádorů včetně melanomu, je chronický zánět. Ten podporuje iniciaci nádorů zvýšením četnosti DNA mutací i produkcí kyslíkových a dusíkových radikálů, které zase vyvolávají DNA instabilitu a její poškození. Aktivace tkáňových reparačních mechanismů pak indukuje proliferaci premaligních buněk a posiluje jejich přežívání. Intenzivní expozice kůže slunečnímu UVA i UVB záření vyvolává spálení kůže, tedy zánět, který pak spolu s dalšími účinky UV záření může podporovat rozvoj všech kožních nádorů včetně melanomu [3]. Stav imunitního systému hraje při vzniku melanomu jednu z velmi významných rolí. Melanom má na svém povrchu řadu antigenů, přesto dokáže často uniknout imunitnímu dohledu hostitele. Nádorové buňky jsou vybaveny četnými inhibičními mechanismy, které při interakci melanomu s T infiltrujícími lymfocyty mohou imunitní reakci zablokovat, nádorové buňky se stanou pro imunitní systém neviditelné, vzniká nádorová tolerance [4]. Úkolem protinádorové imunoterapie je jednak zvýšení exprese či

prezentace nádorových antigenů a jednak modulace imunitního systému tak, aby byl schopen účinně reagovat proti nádorovým buňkám.

Imunoterapie melanomu

Již před desítkami let bylo prokázáno, že na různé formy imunoterapie odpovídá stabilně 10–30 % nemocných s metastazujícím melanomem [5]. Stále je ale obtížné zjistit, co způsobuje, že právě tyto nemocní na imunoterapii reagují. Na průběhu onemocnění, jeho progresi či regresi se velmi pravděpodobně stejnou měrou podílejí biologické vlastnosti nádoru a imunitní systém hostitele. Mezi mnoho let ověřované a rozvíjené imunoterapeutické postupy u metastazujícího melanomu patří různé typy nádorových vakcín, cytokinů i adoptivní imunoterapie. Žádná z těchto metod ale neprokázala takovou účinnost, která by našla uplatnění i v běžné klinické praxi, a nebudou proto předmětem tohoto sdělení.

Pochopení principů interakce mezi imunitním systémem a nádorovými buňkami vedlo v posledních letech k identifikaci řady klíčových molekul, které tento proces ovlivňují, a umožnilo významný rozvoj nových imunoterapeutických postupů. Jedním ze záměrů současné protinádorové imunoterapie je přerušení nádorové tolerance a restaurace přirozené funkce cytotoxických T lymfocytů s využitím monoklonálních protilátek (monoclonal antibodies – MoAb). Imunomodulační MoAb mohou být zaměřené na různé cíle v imunitním systému a jejich úkolem je vyvolat novou nebo odbrzdit z různých důvodů pouze dočasně zablokovanou imunitní reakci. Mohou být namířené proti inhibičním receptorům exprimovaným na aktivovaných T lymfocytech, jako jsou např. CTLA-4 (cytotoxický T-lymfocytární antigen-4) a PD-1 (programmed death-1) receptory či proti ligandům PD-1 receptoru PD-L1 (programmed death ligand-1) a PD-L2 (programmed death ligand-2). Zkouší se MoAb proti KIR receptorům (killer cell immunoglobulin like receptor) NK buněk nebo monoklonální protilátky, které aktivují kostimulační receptory na povrchu imunitních efektorových buněk, jako jsou

TNF (tumour necrosis factor) receptory označované OX40, CD137, GITR, či MoAb neutralizující imunopresivní faktory uvolňované nádorovým mikroprostředím, jako je TGF- β 1 (transforming growth factor β 1) [6]. Do klinické praxe již byly na základě výsledků klinických studií u metastazujícího melanomu zavedeny MoAb proti CTLA-4 (ipilimumab) a proti PD-1 (pembrolizumab a nivolumab).

Anti-CTLA-4

CTLA-4 je jedna z klíčových molekul adaptivní imunitní odpovědi. Za fyziologického stavu je jejím úkolem ztlumit probíhající T lymfocytární reakci, funguje jako zpětnovazební negativní regulátor imunitní odpovědi. CTLA-4 brání nadměrné imunitní reakci, chrání před vznikem autoimunity, ale umožňuje vznik nádorové tolerance. Zablokování CTLA-4 ruší jeho inhibiční účinky, udržuje aktivitu T lymfocytů a tím i jejich případnou protinádorovou reakci. Zdá se, že blokáda CTLA-4 aktivuje i T lymfocyty, které jsou schopné reagovat proti vlastním antigenům nebo potlačovat Treg kontrolující za fyziologických okolností autoreaktivní efektorové T lymfocyty. To může být jedním z důvodů autoimunitních reakcí provázejících inhibici CTLA-4 [7]. V léčbě melanomu se zkoušely dvě MoAb namířené proti CTLA-4 – ipilimumab a tremelimumab, ale v současné době přešel do dalšího klinického využití pouze ipilimumab.

Ipilimumab

Ipilimumab je plně humánní IgG1 MoAb proti inhibičnímu receptoru CTLA-4 exprimovanému na aktivovaných cytotoxických T lymfocytech, který byl zkoušen u mnoha různých typů nádorů včetně melanomu. První studie fáze I a II, které hodnotily různé dávkování ipilimumabu i možnosti kombinací s vakcínami, dakarbazinem (DTIC) nebo cytokiny, naznačily jeho účinnost v léčbě metastazujícího melanomu i bezpečnost uvedených kombinací. Snížené renální funkce nebo hepatální dysfunkce neovlivňují významně farmakokinetiku ipilimumabu, stejně tak jako věk, pohlaví či pozitivita protilátek proti ipilimumabu [8].

Zásadní pro další klinické využití ipilimumabu byly dvě opakovaně citované studie – MDX010-20 a CA184-024. První z nich, registrační studie fáze III, jako první v historii léčby metastazujícího melanomu prokázala statisticky významnou účinnost ipilimumabu v prodloužení celkového přežití (overall survival – OS). Do studie bylo zařazeno 676 nemocných s metastazujícím melanomem, u kterých selhala minimálně jedna předchozí léčba. Trojramenná studie porovnávala účinnost monoterapie ipilimumabem v dávce 3 mg/kg proti kombinované léčbě ipilimumabem s gp100 vakcínou (ipilimumab + glykoprotein) či proti monoterapii gp100 vakcínou. Ipilimumab byl podáván ve třítydenních intervalech, celkem čtyři dávky. Při prvním hodnocení a mediánu sledování 20 měsíců byl medián OS 10,0 a 10,1 měsíce u pacientů léčených kombinací ipilimumab + glykoprotein a monoterapií ipilimumabem, zatímco u nemocných léčených samotnou gp100 vakcínou byl medián OS pouze 6,4 měsíce [9]. Rozdíl byl statisticky významný. Četnost léčebných odpovědí (response rate – RR) byla sice pouze 10,9 %, ale 60 % odpovědí přetrvávalo déle než dva roky [9]. Výsledky byly, na rozdíl od všech předchozích studií, natolik přesvědčivé, že na jejich základě byl ipilimumab v roce 2010 schválen FDA (Food and Drug Administration) a následně i EMA (European Medicines Agency) ve 2. linii léčby metastazujícího inoperabilního melanomu.

Do druhé studie označované CA184-024 byli zařazováni nemocní, kteří dosud nebyli pro metastazující melanom léčeni. Jednalo se o dvouramennou studii hodnotící účinnost ipilimumabu v dávce 10 mg/kg v kombinaci s DTIC proti monoterapii DTIC. Při kombinované léčbě došlo ke 24% snížení rizika progresu onemocnění a medián OS byl 11,2 měsíce u kombinace proti 9,1 měsíce při monoterapii DTIC [10]. Na rozdíl od předchozí studie byla léčba podávána do progresu či neúnosné toxicity léčby, ale po pěti letech byla přežívajícím nemocným nabídnuta možnost ukončení léčby. Výsledky této studie byly pro FDA i EMA základem pro schválení ipilimumabu i v 1. linii léčby metastazujícího melanomu. Následné sledování nemoc-

ných ve studii prokázalo, že dosažené léčebné odpovědi přetrvávají mnoho měsíců i let, čtyři roky po zahájení léčby přeživalo téměř 20 % pacientů [11].

Také řada dalších studií fáze II a III potvrdila účinnost ipilimumabu v léčbě metastazujícího melanomu charakterizovanou nižší četností léčebných odpovědí na úrovni 10–15 %, ale velmi dlouhou dobou jejich trvání. Pacienti, kteří na léčbu ipilimumabem zareagují, mají vysokou šanci na mnohaleté přežití. V současné době je FDA i EMA schválen ipilimumab pro 1. a 2. linii léčby metastazujícího melanomu. Aplikuje se v 90 min trvající nitrožilní infuzi v dávce 3 mg/kg celkem čtyřikrát v třítydenních intervalech. Objevují se první práce naznačující, že by doba aplikace mohla být zkrácena na 30 min [12].

Mechanismus účinku ipilimumabu je odlišný od principu chemoterapie a vzhledem k tomu je možné pozorovat i rozdílné typy léčebných odpovědí. Doba potřebná pro nastolení protinádorové imunitní odpovědi je delší než doba potřebná k přímému cytotoxickému účinku, a proto se odpovědi objevují většinou významně později. Popisovány jsou minimálně čtyři rozdílné typy léčebných odpovědí. Je to jednak typická částečná (partial remission – PR) či kompletní (complete remission – CR) odpověď jako u chemoterapie, nebo pouze velmi pomalé a nepatrné zmenšování nádoru hodnocené jako stabilizace onemocnění (stable disease – SD), která ale následně v odstupu mnoha týdnů či měsíců může přecházet v PR či CR. Výjimkou ale nejsou ani zcela atypické odpovědi, kdy ke zmenšení nádoru dochází až po jeho přechodném zvětšení, které imituje progresi onemocnění, nebo zmenšování celkové masy nádoru při současném vzniku nových ložisek. Hodnocení léčebných odpovědí v mnoha ipilimumabových studiích ukázalo na nutnost zavedení nových hodnotících kritérií – irRC (immune related response criteria), která na rozdíl od klasických RECIST nebo WHO kritérií berou v úvahu i uvedenou dynamiku odpovědí při léčbě ipilimumabem [13].

Nežádoucí účinky (NÚ) léčby jsou podmíněny také mechanismem účinku ipilimumabu. Potlačení inhibiční funkce

CTLA-4 receptoru znamená kromě zvýšené protinádorové aktivity také zvýšené riziko vzniku autoimunitních reakcí. Imunitně podmíněné NÚ dominují v toxicitě této léčby, a označují se proto jako irAEs (immune related adverse events). Jejich četnost i intenzita se zvyšuje s dávkou ipilimumabu. Při použití schváleného dávkování 3 mg/kg se objevují irAEs asi u 60 % nemocných, ale pouze u 10–15 % z nich se jedná o závažné NÚ stupně 3–4. Mezi nejčastější patří kožní toxicita v podobě generalizovaného pruritu nebo makulopapulózního exantému či vznik vitiliga. Nejzávažnější je gastrointestinální (GI) toxicita projevující se průjmovitou stolicí a v těžších případech kolitidou. Hepatotoxicitu se projevuje často pouze elevací transamináz či bilirubinu, bez klinických příznaků. Typickým NÚ při léčbě ipilimumabem je také endokrinní toxicita projevující se buď autoimunní thyreoiditidou, nebo hypofyzitidou. Lékem volby všech typů NÚ jsou kortikoidy, při závažnosti stupně 3–4 v dávkách 1–2 mg/kg. U endokrinní toxicity bývá nezbytná trvalá hormonální substituce. Základem úspěchu léčby NÚ je její včasné zahájení [14].

Anti-PD-1 a PD-L1

Imunoonkologická léčba se snaží posílit nebo oživit vrozenou schopnost imunitního systému rozpoznávat cizorodé antigeny a za takové lze považovat i nádorové buňky. Další možností, jak potencevat imunitní systém, je inhibice PD-1 receptoru. Na rozdíl od CTLA-4 ovlivňuje PD-1 spíše pozdější efektorovou fázi imunitní reakce [15]. Zvýšenou expresi PD-1 receptoru na T lymfocytech vyvolává dlouhodobá zvýšená expozice cizorodým antigenům, např. při chronicky probíhajících infekcích nebo u nádorových onemocnění. Expresie ligandů pro PD-1 (označované PD-L1 a PD-L2) je indukována zánětlivými cytokiny, zejména INF- γ . PD-L1 bývá detekován na mnoha typech buněk, včetně nádorových, kde se předpokládá, že zvýšenou expresi vyvolává onkogenní signalizace. Po vazbě PD-1 s ligandem PD-L1 dochází ke spuštění inhibičního signálu, jehož výsledkem je anergie T lymfocytů a zablokování protinádorové imunitní reakce. Expresie PD-L1 bývá pozorována

u řady nádorů včetně melanomu a je považována za jeden z mechanismů, kterými nádor uniká z dosahu imunitní kontroly, a současně často provází zvýšenou tumorigenezi a invazivitu nádorů. Zablokování vazby mezi PD-1 a PD-L1 oživuje imunitní reakce v oblasti nádoru např. tím, že obnovuje aktivitu TILs (tumor infiltrating lymphocytes) buněk [16].

Nejčastěji zkoušenými monoklonálními protilátkami proti PD-1 receptoru jsou v současné době nivolumab a pembrolizumab, které již obdržely schválení FDA pro léčbu melanomu, a pidilizumab.

Nivolumab

Nivolumab je plně humánní IgG4 monoklonální protilátka proti PD-1 receptoru selektivně blokující jeho vazbu s PD-L1 a PD-L2 ligandy. Klinické studie fáze I byly zahájeny již v roce 2006 a jejich výsledky naznačovaly dobrou účinnost v léčbě různých solidních nádorů včetně melanomu a nižší toxicitu než při léčbě ipilimumabem nebo chemoterapií. Základem byla studie fáze I, ve které byl nivolumab podáván v několika dávkách (0,1–0,3–1,0–3,0–10 mg/kg) pacientům s různými typy nádorů, převážně se jednalo o melanom, plicní karcinom a renální karcinom. Objektivní léčebné odpovědi (overall response rate – ORR) byly popsány u 28 % nemocných a v případě použití dávky 3 mg/kg u 41 % pacientů. Nivolumab byl dobře tolerován, nejčastějšími NÚ byly únava, průjmy, kožní toxicita, nechutenství a pneumonitida [17]. V roce 2014 byly publikovány výsledky dlouhodobého sledování pacientů s melanomem, kteří byli léčeni nivolumabem každé dva týdny po dobu 96 týdnů. Základním cílem bylo hodnocení OS, délka trvání léčebné odpovědi po ukončení léčby a dlouhodobá bezpečnost. Medián OS byl 16,8 měsíce a jeden rok přežívalo 62 % nemocných, dva roky 43 % pacientů. U 31 % nemocných byla patrná ORR s mediánem trvání 2 roky. Léčebné odpovědi pokračovaly i po ukončení léčby v rozmezí 16–56 týdnů. Nebyla pozorována nečekaná toxicita ani kumulativní toxicita a NÚ se v naprosté většině případů objevovaly v prvních šesti měsících léčby [18]. Účinnost nivolumabu byla

porovnána také s účinností chemoterapie. V letošním roce byly publikovány výsledky studie CheckMate 037. Do této studie bylo zařazeno 631 nemocných, kteří progredovali po léčbě ipilimumabem a pokud měli pozitivní *BRAF* mutaci, i po léčbě *BRAF* inhibitory. Jednalo se tedy o léčbu min. 2. linie. Nemocní byli randomizováni v poměru 2 : 1 na nivolumab nebo chemoterapii, jejíž výběr byl na zvážení ošetřujícího lékaře. Hlavními stratifikačními kritérii byly stav *BRAF* mutace, exprese PD-L1 nádorovými buňkami a odpověď na předchozí léčbu ipilimumabem. Primárními cíli studie byla četnost ORR a OS, s hodnocením v době, kdy prvních 120 pacientů léčených nivolumabem bylo sledováno min. 24 týdnů. ORR byly popsány u 31,7 % nemocných léčených nivolumabem proti 10,6 % pacientů ve skupině s chemoterapií. Medián doby do odpovědi byl 2,1 měsíce u nivolumabu a 3,5 měsíce u chemoterapie. Medián doby trvání ORR nebyl u nivolumabu dosažen a u chemoterapie byl 3,6 měsíce. Při porovnávání ORR podle stratifikačních kritérií nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly ani podle *BRAF* pozitivity či negativity, ani podle odpovědi na předchozí léčbu ipilimumabem. Překvapivě nebyl statisticky významný rozdíl v ORR ani podle exprese PD-L1 nádorem. Nicméně u nemocných s pozitivními PD-L1 melanomy bylo popsáno 44 % ORR proti pouhým 20 % u negativních PD-L1 nádorů. Nebyla pozorována žádná nečekaná toxicita nivolumabu [19]. Nivolumab prokazuje významně vyšší účinnost proti chemoterapii i v 1. linii léčby, jak ukazují výsledky studie publikované v letošním roce v *New England Journal of Medicine*. Do studie bylo zařazeno 418 pacientů s metastazujícím melanomem, kteří nebyli dosud léčeni a měli negativní *BRAF* mutaci. Primárním cílem studie bylo OS. Po prvním roce přežívalo 72,9 % nemocných léčených nivolumabem proti 42,1 % léčeným DTIC (HR 0,42; 95% CI 0,25–0,73; $p < 0,001$). Medián přežití bez progresu (progression-free survival – PFS) byl 5,1 měsíce u nivolumabu proti 2,2 měsíce u chemoterapie (HR 0,43; 95% CI 0,34–0,56; $p < 0,001$) a ORR byla 40,0 % ve skupině s nivoluma-

bem proti 13,9 % ve skupině s DTIC. Nejčastějšími NÚ byly únava, svědění kůže a nauzea. NÚ stupně 3–4 byly popsány u 11,7 % nemocných léčených nivolumabem a u 17,6 pacientů léčených DTIC [20]. Účinnost nivolumabu není závislá na stavu *BRAF* mutace. Ukazuje to retrospektivní analýza čtyř studií, do kterých bylo zařazeno 440 pacientů s metastazujícím melanomem. Všichni měli vyšetřenou *BRAF* mutaci a byli léčeni různými dávkami nivolumabu. Výsledky naznačují, že účinnost nivolumabu nebyla ovlivněna ani stavem *BRAF* mutace, ani předchozí léčbou *BRAF* inhibitory nebo ipilimumabem [21].

Pembrolizumab

Pembrolizumab je vysoce selektivní humanizovaná IgG4 monoklonální protilátka proti PD-1 receptoru. Zásadní pro klinické využití tohoto léku byly výsledky studie fáze I publikované v roce 2014. V této studii byli léčeni nemocní, u kterých došlo k progresi melanomu po minimálně dvou dávkách ipilimumabu. Byla porovnávána účinnost pembrolizumabu v dávce 2 mg/kg každé tři týdny proti 10 mg/kg každé tři týdny. Léčba byla podávána do progresu či toxicity. Primárním cílem studie byla ORR hodnocená podle RECIST kritérií nezávislou komisí. V době hodnocení byl medián sledování 8 měsíců. ORR byla u obou dávek 26 % a nelišila se ani toxicita, kdy nejčastějšími NÚ byla únava, svědění kůže a kožní exantém. Výsledky potvrdily účinnost pembrolizumabu v léčbě metastazujícího melanomu a byly základem pro jeho schválení FDA [22]. V další publikované studii byla porovnávána účinnost pembrolizumabu s ipilimumabem v léčbě metastazujícího melanomu. Pacienti, celkem bylo zařazeno 834 nemocných, byli randomizováni do tří ramen, na léčbu pembrolizumabem v dávce 10 mg/kg v intervalu dvou nebo tří týdnů anebo na léčbu ipilimumabem v dávce 3 mg/kg celkem čtyřikrát v třítydenních intervalech. Primárním cílem studie bylo hodnocení PFS a OS. Při první interim analýze bylo prokázáno, že obě dávky pembrolizumabu významně prodlužují PFS, odhadovaný medián PFS byl 5,5 a 4,1 měsíce u pembrolizumabu a 2,8 měsíce u ipilimumabu. Odhado-

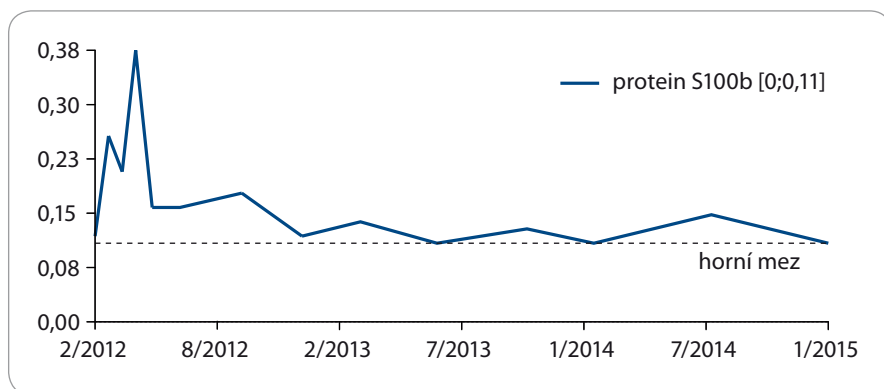
vané jednorozměrné OS bylo, při minimálně 12měsíčním sledování všech pacientů, 74,1 a 68,4 % pro nemocné léčené pembrolizumabem a 58,2 % pro pacienty léčené ipilimumabem. Medián OS nebyl dosažen v žádné skupině. Četnost léčebných odpovědí dosáhla 33,7 a 32,9 % u pembrolizumabu a 11,9 % u ipilimumabu. Z toho CR byly u 5,0, 6,1 a 1,4 %. Převažujícími NÚ byly opět únava, průjem a kožní toxicita. Studie prokázala, že pembrolizumab je schopný prodloužit PFS i OS a že má nižší toxicitu než ipilimumab [23]. Stejně jako u nivolumabu byla i u pembrolizumabu porovnávána jeho účinnost s chemoterapií. První výsledky studie KEYNOTE-002 byly publikovány v červnu letošního roku. Do studie bylo zařazeno 540 pacientů s metastazujícím melanomem, u kterých selhala předchozí léčba ipilimumabem a v případě positivity *BRAF* mutace i léčba *BRAF* inhibitory. Nemocní byli randomizováni do tří ramen, pembrolizumab v dávce 2 mg/kg nebo 10 mg/kg každé tři týdny a dále chemoterapie podle zvažování ošetřujícího lékaře. Hlavními stratifikačními kritérii byl celkový stav pacienta, hodnota LDH a stav *BRAF* mutace. V současné době byl již uzavřen nábor pacientů do studie, ale pokračuje sledování i případná aplikace léčby. Předběžné výsledky ukazují, že PFS bylo u nemocných léčených pembrolizumabem proti chemoterapii významně zlepšeno, jak při dávce 2 mg/kg (HR 0,57; 95% CI 0,45–0,73; $p < 0,0001$), tak při dávce 10 mg/kg (95% CI 0,50, 0,39–0,64; $p < 0,0001$). Byla též potvrzena nižší toxicita proti chemoterapii a nebyly zaznamenány žádné neočekávané NÚ [24].

Nivolumab i pembrolizumab jsou účinné monoklonální protilátky proti PD-1 receptoru vyvolávající vyšší četnost léčebných odpovědí než inhibice CTLA-4 a menší toxicitu. Obě jsou v současné době schváleny FDA i EMA pro léčbu metastazujícího melanomu.

Kombinovaná imunoterapie

Inhibice CTLA-4 se projevuje převážně v časných stádiích aktivace T lymfocytů, inhibice PD-1 ovlivňuje T lymfocyty zejména v efektorové fázi, v mikroprostředí nádoru. Rozdílnost oblastí působení těchto MoAb naznačuje jejich

možné komplementární účinky. První klinický experiment s kombinací ipilimumabu a nivolumabu v léčbě melanomu proběhl již v roce 2009, kdy se ověřovaly různé dávky obou preparátů. Z 53 tehdy léčených pacientů byla pozorována CR u pěti a PR u 16 nemocných. Překvapující byla rychlá léčebná odpověď se zmenšením nádorových mas o ≥ 80 % i dlouhá doba trvání odpovědi [25]. Na základě těchto výsledků pak byly naprojektovány další studie fáze III s kombinací nivolumabu a ipilimumabu. Velmi slibné výsledky přinesla studie Checkmate 067, v které byla porovnávána účinnost kombinované léčby nivolumab + ipilimumab proti monoterapii nivolumabem a monoterapii ipilimumabem. Do studie bylo zařazeno 945 dosud neléčených pacientů s metastazujícím melanomem. Medián PFS při kombinaci nivolumab + ipilimumab dosáhl 11,5 měsíce proti 2,9 měsíce u monoterapie ipilimumabem (HR 0,42) a 6,9 měsíce při monoterapii nivolumabem (HR 0,57). Pacienti, kteří měli pozitivní expresi ligandu PD-L1 na nádorových buňkách, měli medián PFS 14 měsíců jak u kombinované léčby, tak při monoterapii nivolumabem, při monoterapii ipilimumabem byl u těchto nemocných medián PFS 3,9 měsíce. Trochu překvapivě bylo u pacientů s nádory PD-L1 negativními léčenými kombinací nivolumab + ipilimumab delší PFS – 11,2 měsíce proti pouze 5,3 měsíce při monoterapii nivolumabem. Výsledky naznačují, že kombinovaná léčba je významně účinnější proti monoterapii anti-CTLA-4 i proti monoterapii anti-PD-1. Vyšší je ale také toxicita, NÚ stupně 3–4 byly pozorovány u 55 % nemocných léčených kombinací nivolumab + ipilimumab, u 16,3 % léčených nivolumabem a u 27,3 % léčených ipilimumabem. Na hodnocení OS je zatím příliš brzy, první data budou dostupná pravděpodobně v průběhu příštího roku [26]. Také další studie publikovaná v letošním roce porovnávala účinnost kombinované léčby ipilimumab + nivolumab proti monoterapii ipilimumabem. Randomizováno bylo 142 nemocných s dosud neléčeným metastazujícím melanomem se známým stavem *BRAF* mutace. Primárním



Graf 1. Pokles hodnoty S100 proteinu při CR melanomu po léčbě ipilimumabem. CR trvá již tři roky.

CR – kompletní remise

cílem studie byla četnost léčebných odpovědí u BRAF negativních pacientů. K ORR došlo u 61 % nemocných léčebných kombinací a u 22 % byla pozorována CR onemocnění. U pacientů léčebných monoterapií ipilimumabem bylo dosaženo 11 % ORR a u žádného nemocného nedošlo k CR. Ve skupině s kombinovanou léčbou nebylo zatím dosaženo mediánu PFS, u pacientů léčených ipilimumabem byl 4,4 měsíce. V žádné skupině nebylo dosaženo mediánu doby trvání RR. Podobné výsledky byly pozorovány i u nemocných s pozitivní BRAF mutací, nezdá se tedy, že by BRAF mutace ovlivňovala účinnost imunoterapie. Neobjevily se žádné neočekávané NÚ léčby, stupeň 3–4 byl popsán u 54 % pacientů ve skupině s kombinací a u 24 % nemocných léčených ipilimumabem. ORR i PFS jsou signifikantně vyšší u nemocných léčených kombinací nivolumab + ipilimumab proti monoterapii ipilimumabem a i přes vyšší toxicitu je léčbu možné považovat za bezpečnou [27]. Kombinovanou imunoterapii využívající inhibice dvou významných kontrolních bodů imunity CTLA-4 a PD-1 tak můžeme považovat za velmi perspektivní a účinnou léčbu, jejíž využití v klinické praxi je jistě netrpělivě očekáváno.

V současné době je ale u melanomu komerčně dostupný pouze ipilimumab, nyní již v 1. i 2. linii léčby inoperabilního metastazujícího melanomu a velmi brzy budou pravděpodobně dostupné též anti-PD-1 protilátky pembrolizumab a nivolumab, u kterých ale zatím ne-

jsou známá indikační omezení úhrady v ČR.

Biomarkery léčebné odpovědi na imunoterapii

Biomarkery jsou biologické molekuly, které můžeme identifikovat ve tkáních, v krvi nebo v jiných tělních tekutinách jako indikátory nějaké klinicky významné situace. Využívají se pro určení přesnější diagnózy a prognózy onemocnění, odhadu pravděpodobné doby OS, určení účinnosti léčby nebo pro kontrolu jejího průběhu. Biomarkery můžeme rozdělovat na diagnostické, prognostické, zástupné a prediktivní. Za diagnostické biomarkery u melanomu jsou považovány zejména tkáňové biomarkery, jako je S100 protein, HMB 45 nebo Melan A. Prognostické biomarkery korelují s přirozeným průběhem, progresí nebo agresivitou onemocnění. Mohou ukazovat na riziko recidivy i naznačovat pravděpodobnou dobu OS. Využívají se, mimo jiné, pro stratifikaci pacientů v klinických studiích. U melanomu jsou za nejvýznamnější považovány tloušťka nádoru v mm (Breslow), přítomnost ulcerace a hodnota laktátdehydrogenázy (LDH) v séru. Zástupné biomarkery mohou být využívány pro sledování účinnosti léčby, u melanomu můžeme v některých případech považovat za zástupný biomarker hladinu S100 proteinu v séru (graf 1). Význam prediktivních biomarkerů spočívá v určování odpovědi na danou léčbu. Ideální je jejich znalost a dostupnost ještě před zahájením léčby, protože určují, nakolik bude

zvolená léčba účinná. Typickým příkladem je vyšetření BRAF mutace u melanomu. Pozitivita BRAF mutace označuje nemocné, kteří budou profitovat z léčby BRAF inhibitory, a naopak – pokud není BRAF mutace v nádoru prokázána, víme, že léčba BRAF inhibitory nebude účinná a nemá smysl ji podávat. Stav BRAF mutace ale neovlivňuje účinnost imunoterapie. Všechny dosavadní práce ukazují, že na imunoterapii odpovídají bez významného rozdílu pacienti BRAF pozitivní i negativní.

Existují tedy prediktivní markery léčebné odpovědi na imunoterapii?

V současné době probíhá na tomto poli intenzivní výzkum, protože dosud nebyla objevena jednoznačná imunologická nebo nádorová charakteristika, která by byla schopná determinovat odpověď na imunologickou léčbu. Byla ale popsána řada změn v různých imunologických markerech, které jsou pozorovány v průběhu imunoterapie a jsou spojeny s účinnější kontrolou onemocnění i zlepšením OS. V roce 2006 byly publikovány výsledky studie sledující NÚ adjuvantně podávaného INF- α u pacientů s pokročilým melanomem. Na souboru 200 léčených pacientů bylo prokázáno, že vznik autoimunitních reakcí v průběhu podávání INF- α je spojen se statisticky významným prodloužením RFS (relaps-free survival) i OS [28]. Nejčastěji pozorovanými projevy byly autoimunitní tyreoiditida a vitiligo. Bohužel ale dosud nejsme schopni ještě před zahájením léčby INF- α zjistit, u kterého pacienta vyvolá léčba vznik autoimunity, nejedná se tedy o prediktivní, ale pouze o zástupný či prognostický biomarker.

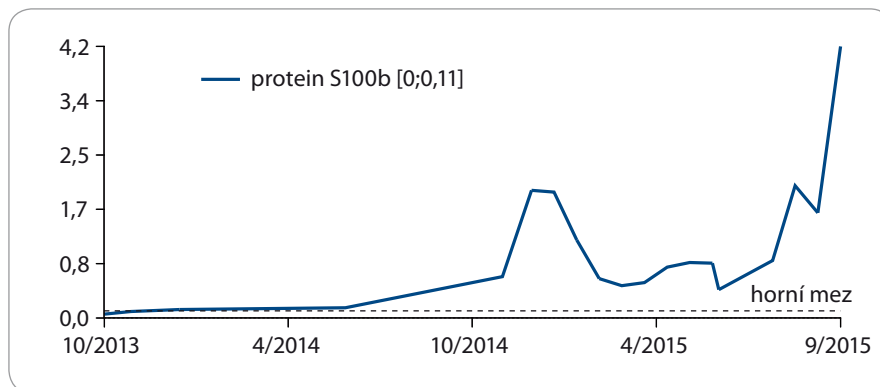
Imunoterapie metastazujícího melanomu inhibitory CTLA-4 vyvolává 15–20 % ORR. Kontrola onemocnění se stabilizací choroby bývá popisována přibližně u 30 % pacientů. Snaha zvýšit četnost léčebných odpovědí a docílit jejich dlouhé doby trvání u co nejvyššího počtu pacientů vyžaduje objevení takových biomarkerů, které by mohly předem určit léčebný účinek a současně by pomohly vybrat jen ty pacienty, kteří budou z léčby nejvíce profitovat.

Stejně jako v případě adjuvantní imunoterapie INF- α neznáme dosud jednoznačné prediktivní markery léčebné

odpovědi na imunoterapii anti-CTLA-4 či anti-PD-1 MoAb. Za nepříznivý prognostický marker je možné považovat elevaci LDH a CRP (C reaktivní protein) již před léčbou nebo jejich zvyšování v průběhu léčby. Stejně tak se u některých nemocných spolu s progresí onemocnění zvyšuje hladina S100 proteinu v séru (graf 2). Elevaci těchto biomarkerů můžeme považovat za známku vyšší závažnosti nebo progresse onemocnění, jedná se ale o prognostické či zastupné ukazatele, nemůžeme je objektivně hodnotit jako prediktivní markery léčebné odpovědi. Nadějně se zdálo hodnocení absolutního počtu lymfocytů v periferní krvi před a v průběhu léčby ipilimumabem [29]. Hodnoty ALC (absolute lymphocyte count) > 1 000 μL označovaly nemocné se statisticky významně delším OS, než měli pacienti s ALC < 1 000 μL , a to jak před zahájením léčby, tak po první i druhé dávce ipilimumabu. Další podobné práce již ale takových jednoznačných výsledků nedosáhly.

Významnou roli by též mohlo hrát mikroprostředí nádoru. Zvýšená exprese Foxp3 a IDO (indoleamine dioxygenase) prokázána v biopsiích z nádoru před zahájením léčby ipilimumabem bývá spojena s vyšší účinností léčby. Zdá se tedy, podobně jako bylo pozorováno při léčbě IL-2, že nádory s výraznou zánětlivou lymfocytární infiltrací lépe odpovídají na léčbu ipilimumabem [30]. Na druhou stranu tento nádorový infiltrát není schopen sám o sobě nádor zlikvidovat, jedním z důvodů může být, že převažují negativní imunitní regulační faktory v důsledku chronicky probíhajícího zánětu.

Expres PD-L1 nádorem je významný, ale přesto zatím ne zcela dostatečný prediktivní biomarker odpovědi na terapeutickou blokádu PD-1. Nádory exprimující receptor PD-L1 odpovídají na léčbu častěji, ale odpovědi je možné pozorovat i u PD-L1 negativních nádorů. Nevýhodou je také omezená možnost vyšetření exprese PD-L1 nádorem, např. při biopstické nedostupnosti metastáz a dále heterogenní exprese PD-L1, která se kromě nádorových buněk nachází také na infiltrujících lymfocytech, monocytech nebo makrofágách.



Graf 2. Vzestup hladiny S100 proteinu korelující s progresí melanomu.

Identifikace biomarkerů označujících subpopulace pacientů nebo nádorů, které budou odpovídat na imunoterapii, je zásadní jak pro pochopení mechanismu účinku imunoterapie, tak pro vývoj nových imunoterapeutických kombinací. Účinnost inhibitorů CTLA-4 a PD-1 kolísá mezi různými typy nádorů i u jednotlivých pacientů a odhadnout předem odpověď je obtížné. Probíhá intenzivní výzkum, ale stále není jasné, jaké metody pro hodnocení interakce imunitního systému a nádoru použít, jak měřit imunitní odpověď nebo které buňky můžeme považovat pro léčebnou odpověď za nejvýznamnější, zda CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, Tregs, MDSC, nebo např. poměr CD8⁺/FoxP3? Nevíme přesně, jak odpověď měřit, protože interpretace jednotlivých vyšetřovacích metod je velmi obtížná. Není také stále jasné, zda bude stačit jeden biomarker, nebo jich bude potřeba více. Odpovědi na tyto otázky musí přinést až další klinické studie.

Závěr

Pokrok v pochopení role imunitního systému při vzniku a progresi nádorů a identifikace významných kontrolních bodů imunity znamenaly nečekaný rozvoj imunoterapie jako velmi účinné léčebné metody u řady nádorů včetně melanomu. Pacienti s metastazujícím melanomem, jejichž pravděpodobná doba OS se pohybovala na úrovni týdnů nebo několika měsíců, mají nyní díky imunoterapii šanci na dlouhodobé OS. Zavedení anti-PD-1 protilátek a jejich kombinace s anti-CTLA-4 významně prohlubuje léčebné odpovědi, zvyšuje jejich četnost a navozuje dlou-

hou dobu jejich trvání. Zvýšená účinnost kombinované léčby je provázena také vyšší toxicitou, která je ale při dodržování základních zásad léčby NÚ imunoterapie dobře a bez následků zvládnutelná. Stále však zůstává mnoho dalších úkolů. Jedním z nich je možnost využití imunoterapie v adjuvantní léčbě pokročilého, vysoce rizikového melanomu. První výsledky studie EORTC 18071 naznačují, že ipilimumab proti placebo významně prodlužuje RFS u pacientů po operaci melanomu stadia III. Medián RFS byl 26,1 měsíce při léčbě ipilimumabem proti 17,1 měsíce ve skupině s placebem (HR 0,75; 95% CI 0,64–0,90; p = 0,0013). V následujícím období se očekávají výsledky hodnocení DMFS (distant metastasis free survival) a OS [31]. Zvýšená toxicita (u 52 % nemocných byla ukončena léčba předčasně pro NÚ) byla nejspíše způsobena použitým dávkováním 10 mg/kg. Pro budoucí adjuvantní studie bude jistě nutné zvážit dávku ipilimumabu i vzhledem k tomu, že v současné době se v léčbě metastazujícího melanomu používá dávka 3 mg/kg. Mezi další úkoly, které je nutné vyřešit, patří nalezení prediktivních biomarkerů léčebné odpovědi či ověření různých možností kombinace imunoterapie s cílenou léčbou BRAF a MEK inhibitory, cytokiny nebo chemoterapií.

Literatura

1. Sullivan RJ, Fisher DE. Understanding the biology of melanoma and therapeutic implications. *Hematol Oncol Clin North Am* 2014; 28(3): 437–453. doi: 10.1016/j.hoc.2014.02.007.
2. Shindo M, Yoshid Y. Regulatory T cells and skin tumors. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2010; 4(3): 249–254.

3. Aris M, Barrio MM, Mordoh J. Lessons from cancer immunoediting in cutaneous melanoma. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012: 192719. doi: 10.1155/2012/192719.
4. Freeman-Keller M, Weber JS. Anti-programmed death receptor 1 immunotherapy in melanoma: rationale, evidence and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol* 2015; 7(1): 12–21. doi: 10.1177/1758834014551747.
5. Rosenberg SA, Packard B, Aebbersold PM et al. Immunotherapy of patients with metastatic melanoma using tumor infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *N Engl J Med* 1988; 319(25): 1676–1680.
6. Galluzzi L, Vacchelli E, Pedro PJ et al. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget* 2014; 5(24): 12472–12508.
7. Luke JJ, Ott PA. PD-1 pathway inhibitors: the next generation of immunotherapy for advanced melanoma. *Oncotarget* 2014; 6(6): 3479–3492.
8. Trinh VA, Hagen B. Ipilimumab for advanced melanoma. *J Oncol Pharm Practice* 2012; 19(3): 195–201. doi: 10.1177/1078155212459100.
9. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363(8): 711–723. doi: 10.1056/NEJMoa1003466.
10. Robert C, Thomas L, Bondarenko I et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2011; 364(26): 2517–2526. doi: 10.1056/NEJMoa1104621.
11. Wolchok JD, Hodi FS, Weber JS et al. Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. *Ann NY Acad Sci* 2013; 1291: 1–13. doi: 10.1111/nyas.12180.
12. Momtaz P, Park V, Panageas KS et al. Safety of infusing ipilimumab over 30 minutes. *J Clin Oncol* 2015; 33(30): 3454–3458. doi: 10.1200/JCO.2015.61.0030.
13. Wolchok JD, Hoos A, O'Day S et al. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin Cancer Res* 2009; 15(23): 7412–7420. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1624.
14. Weber JS, Kähler KC, Hauschild A. Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. *J Clin Oncol* 2012; 30(21): 2691–2697. doi: 10.1200/JCO.2012.41.6750.
15. Luke JJ, Ott PA. PD-1 pathway inhibitors: the next generation of immunotherapy for advanced melanoma. *Oncotarget* 2014; 6(6): 3479–3492.
16. Mahoney KM, Freeman GJ, McDermott DF. The next immune-checkpoint inhibitors: PD-1/PD-L1 blockade in melanoma. *Clin Ther* 2015; 37(4): 764–782. doi: 10.1016/j.clinthera.2015.02.018.
17. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR et al. Safety, activity and immune correlates of antiPD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(26): 2443–2454. doi: 10.1056/NEJMoa1200690.
18. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF et al. Survival durable tumor remission and long term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* 2014; 32(10): 1020–1030. doi: 10.1200/JCO.2013.53.0105.
19. Weber SJ, D'Angelo SP, Minor D et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomized, controlled, open label phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(4): 375–384. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70076-8.
20. Robert C, Long VG, Brady B et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* 2015; 372(4): 320–330. doi: 10.1056/NEJMoa1412082.
21. Larkin J, Lao CD, Urba WJ et al. Efficacy and safety of nivolumab in patients with BRAF V600 mutant and BRAF wild-type advanced melanoma: a pooled analysis of 4 clinical trials. *JAMA Oncol* 2015; 1(4): 433–440. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.1184.
22. Robert C, Ribas A, Wolchok JD et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab refractory advanced melanoma: a randomized dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet* 2014; 384(9948): 1109–1117. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60958-2.
23. Robert C, Schachter J, Long VG et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (Keynote-002): a randomized, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(8): 908–918. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00083-2.
24. Ribas A, Puzanov I, Dummer R et al. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (Keynote-002): a randomized, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(8): 908–918. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00083-2.
25. Wolchok JD, Kluger H, Callahan H et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2013; 369(2): 122–133. doi: 10.1056/NEJMoa1302369.
26. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzales R et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015; 373(1): 23–34. doi: 10.1056/NEJMoa1504030.
27. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015; 372(21): 2006–2017. doi: 10.1056/NEJMoa1414428.
28. Gogas H, Ioannovich J, Dafni U et al. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with Interferon alfa. *N Engl J Med* 2006; 354(7): 709–718.
29. Ku YG, Yuna J, Page DB et al. Single-institution experience with ipilimumab in advanced melanoma patients in the compassionate use setting. Lymphocyte count after 2 doses correlates with survival. *Cancer* 2010; 116(7): 1767–1775. doi: 10.1002/cncr.24951.
30. Mahoney MK, Atkins MB. Prognostic and predictive markers for the new immunotherapies. *Oncology* 2014; 28 (Suppl 3): 39–48.
31. Eggermont AM, Chiarion-Sileni V, Grob JJ et al. Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): a randomized double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(5): 522–530. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70122-1.